

اثر گلوکاتایون بر نامتراکم شدن کروماتین هسته اسپرم انسان

محسن سقا M.Sc.*[§]، محمدحسین نصرافصفهانی Ph.D.*[§]، مجتبی رضازاده Ph.D.*[§]

[§] دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

* دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه جنین‌شناسی و پژوهشکده رویان

[§] دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح و پژوهشکده رویان

[§] آدرس مکاتبه: اردبیل، خیابان راه دانشگاه، بالاتر از دریاچه شورابیل، کدپستی ۵۶۱۹۷

چکیده

*** هدف:** بررسی تأثیر غلظتهای مختلف گلوکاتایون بر میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرم انسان
*** مواد و روشها:** پس از تهیه و آنالیز نمونه مایع منی، رسوب اسپرمی دوبار با محیط کشت Ham's F-10 شستشو و پس از آن محلول اسپرمی به دو گروه غیرشستشو و شستشو تقسیم شدند که در هر یک از این گروهها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسپرمی در معرض ۱۰۰ میکرولیتر از غلظتهای مختلف گلوکاتایون ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی مولار قرار گرفت که هر یک از این غلظتها طی زمانهای ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه بر اسپرم تأثیر داده شدند. در گروه کنترل به جای گلوکاتایون از محیط کشت Ham's F-10 استفاده شد. در نهایت با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرمها مطالعه شد.
*** یافته‌ها:**

گروه غیر شستشو: در این گروه غلظتهای ۱ تا ۱۰ میلی مولار گلوکاتایون تأثیر چندانی بر کروماتین اسپرم نداشتند و غلظتهای ۱۵ و ۲۰ میلی مولار تأثیر بهتری را بر کروماتین اسپرم نشان دادند. گلوکاتایون بهترین تأثیر را در این گروه در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار نشان داد.

گروه شستشو: در این گروه، غلظتهای ۱ تا ۵ میلی مولار گلوکاتایون تأثیر ضعیفی را بر میزان نامتراکم شدن هسته اسپرم نشان دادند؛ در حالی که در غلظت ۲۰ میلی مولار اختلاف معنی داری با گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$). در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار نیز بهترین تأثیر گلوکاتایون بر کروماتین اسپرمها دیده شد.

*** نتیجه‌گیری:** گلوکاتایون قادر است در محیط آزمایشگاهی سبب القای نامتراکم شدن اسپرمها شود که این تأثیر گلوکاتایون وابسته به غلظت بوده و در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار، این عدم تراکم بیشتر است. همچنین گلوکاتایون قادر است با عبور از غشای پلاسمایی نامتراکم شدن کروماتین اسپرمها را سبب شود و چنانچه بر اسپرمهایی که از کروماتین بسیار پایداری برخوردار هستند تأثیر داده شود ممکن است درصد لقاح را افزایش دهد.

کل واژگان: لقاح، گلوکاتایون، نامتراکم شدن کروماتین اسپرم

احیاء کننده پیوندهای دی سولفیدی است؛ ممکن است شانس تشکیل پیش هسته تر و درصد لقاح را افزایش دهد، به همین دلیل در تحقیق حاضر، تأثیر گلو تاتیون در محیط *in vitro* بر هسته اسپرم بررسی شد.

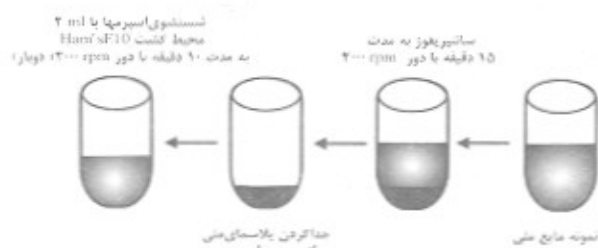
مواد و روشها

* تهیه نمونه مایع منی

نمونه مایع منی از افرادی که به مدت ۳-۷ روز از مقاربت با همسر خویش خودداری کردند به دست آمده و در دمای معمولی اتاق پس از گذشت ۳۰-۲۰ دقیقه از حالت لخته در آمد و آبکی شد؛ سپس نمونه ها از نظر تعداد، میزان تحرک و مرفولوژی اسپرم، pH، ویسکوزیته و سایر پارامترهای آنالیز مایع منی بررسی شدند و فقط نمونه هایی که شاخصهای فوق را مطابق با سازمان جهانی بهداشت (WHO) در حد طبیعی دارا بودند برای انجام آزمایش انتخاب شدند.

* تأثیر گلو تاتیون بر اسپرم

ابتدا نمونه مایع منی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد تا پلاسمای منی از رسوب اسپرمی جدا شود، آنگاه این رسوب اسپرمی با محیط کشت Ham's F-10 دویار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شستشو شد (دیاگرام ۱).



دیاگرام ۱: نحوه تهیه محلول اسپرمی شسته شده از نمونه مایع منی

پس از شستشو ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول اسپرمی در معرض ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظتهای مختلف گلو تاتیون (۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی مولار) قرار گرفت. گلو تاتیون در هر یک از غلظتهای فوق طی زمانهای ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه بر اسپرم تأثیر داده شد (دیاگرام ۲). در گروه کنترل به ۱۰۰ میکرو لیتر محلول اسپرمی، ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت Ham's F-10 اضافه شد (لوله C). محلولهای اسپرمی که به آنها گلو تاتیون اضافه شد به دو گروه تقسیم شدند: در گروه اول (لوله B) به ۵۰ میکرو لیتر از محلول اسپرمی، ۳۵۰ میکرو لیتر، سدیم دودسیل سولفات (SDS) یک درصد حل شده در محلول بورات بافر ۰/۰۵ مولار (pH=۹) اضافه شد. این گروه به عنوان گروه غیر شستشو در نظر گرفته شد؛ در حالی که در گروه دوم (لوله A)

مقدمه

محققان تاکنون پارامترهای مختلفی را برای علل نازایی در مردان ذکر کرده اند که از آن جمله می توان به کاهش تعداد اسپرمها، غیر طبیعی بودن مرفولوژی اسپرم، کاهش قدرت تحرک آن، و غیر طبیعی بودن حجم، رنگ، pH، قوام مایع منی و... اشاره کرد. یکی از مهمترین علت نازایی مربوط به وضعیت پایداری کروماتین هسته اسپرم است (۱).

در شرایط طبیعی طی فرایند اسپرمیوز، مولکولهای پروتئینی کوچکی به نام پروتامینها جای هیستونهای متصل به DNA سلول اسپرماتید را گرفته و ۸۵ درصد از ساختمان نوکلئوپروتئینی اسپرمها را تشکیل می دهند که این امر سبب متراکم شدن^۱ بیشتر کروماتین اسپرم می شود. ۱۵ درصد بقیه نوکلئوپروتئینها را هیستونها تشکیل می دهند (۲).

پس در طی عبور اسپرم از اپی دیدیم به علت وجود اسید آمینه سیستین (Cys) در ساختمان مولکول پروتامین بین این مولکولها پیوندهای دی سولفیدی به وجود می آید که این عمل سبب پایداری کروماتین متراکم شده اسپرم می شود (۳). تصور بر این است که اکسیداسیون گروههای تیولی Cys (-SH) در حفاظت کروماتین از اتولیز در دستگاه تناسلی ماده نقش مهمی دارد (۴)؛ از طرف دیگر بین همه گروههای تیولی مربوط به Cys پروتامینها پیوندهای دی سولفیدی به وجود نمی آید، بلکه تعدادی از این گروههای تیولی به Zn^{+2} رها شده از پروستات متصل شده و بدین ترتیب از پایداری بیش از حد کروماتین اسپرم که می تواند یکی از عوامل مهم نازایی باشد جلوگیری می شود (۵).

۷۸

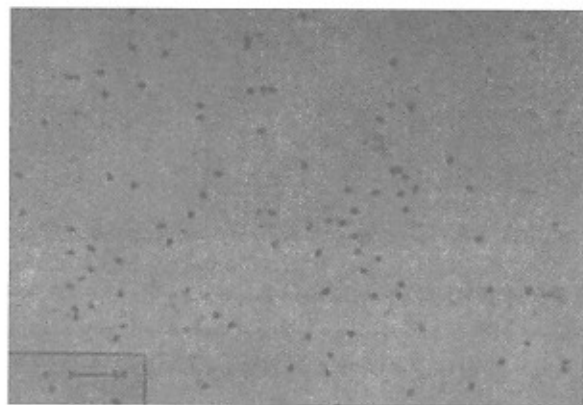
در طی لقاح، هسته اسپرم نامتراکم شده و به پیش هسته تر تبدیل می شود (۷). بر ریهایی که با تزریق اسپرمها به درون تخمک (ICSI)^۲ صورت گرفته نشان می دهد که احیای پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامین برای نامتراکم شدن کروماتین اسپرم (NCD)^۳ و تشکیل پیش هسته تر لازم است. مطالعات نشان می دهد که در محیط آزمایشگاهی دی تیوتریتول (DTT)^۴ و EDTA^۵ می توان (NCD) را در اسپرم لقاح نمود. DTT باعث احیای پلهای دی سولفیدی گروه تیول در پروتئینها می شود و EDTA یک کیلاتور است (۸، ۹). گلو تاتیون (GSH)، تیول آزاد و اصلی داخل سلولی، نقش مهمی در احیای پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامین و نامتراکم کردن کروماتین هسته اسپرم دارد (۷، ۱۰، ۱۱).

امروزه تکنیک جایگزین تکنیکهای قدیمی درمان نازایی نظیر SUZI و PZD^۶ شده است (۱۲، ۱۳). در این تکنیک چون اسپرم با غشای پلاسمایی سالم به درون تخمک تزریق می شود وجود کروماتین بسیار متراکم و غشای پلاسمایی در سر اسپرم تزریق شده به داخل تخمک ممکن است دلیلی برای کاهش درصد لقاح در فرایند ICSI باشد.

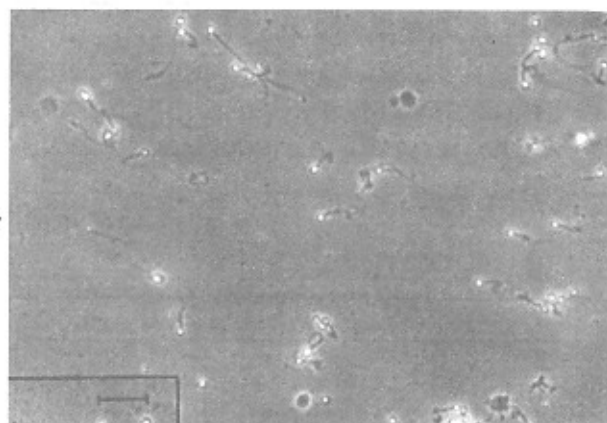
بنابراین تسهیل در فرآیند NCD در محیط آزمایشگاهی قبل از ICSI ممکن است با شکسته شدن پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامین اسپرمهای بسیار متراکم باعث افزایش درصد لقاح شود و NCD اسپرم قبل از ICSI توسط گلو تاتیون که یک عامل

1. Condensation
2. Intra Cytoplasmic Sperm Injection
3. Nuclear Chromatin Decondensation
4. Dithiothreitol
5. Ethylenediamine Tetraacetic Acid
6. Sodium Dodecyl Sulfate

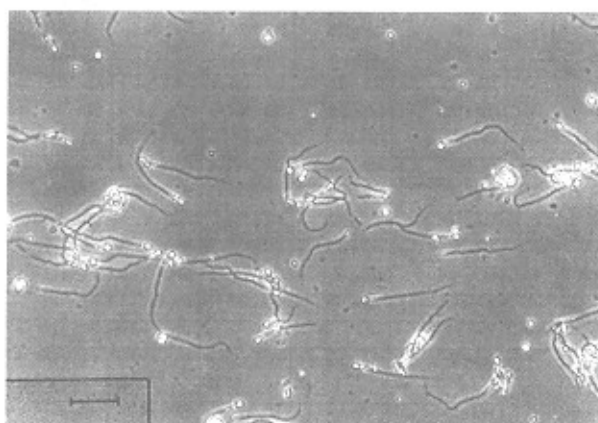
درجه بندی کلی اسیرمها با توجه به فرمول زیر بود:
(اسیرمهای دارای درجه ۲) $\times 2 +$ (اسیرمهای دارای درجه ۱) = درجه بندی کلی
بنابراین بر اساس درجه بندی فوق درجه بندی کلی صد اسیرم بین صفر تا دویست خواهد بود (۱۵، ۱۶).



شکل ۱: فتومیکروگراف از اسیرمهای طبیعی
(فاز کنترل، رنگ آمیزی: پاپانیکولا، بزرگمایی: $\times 400$)

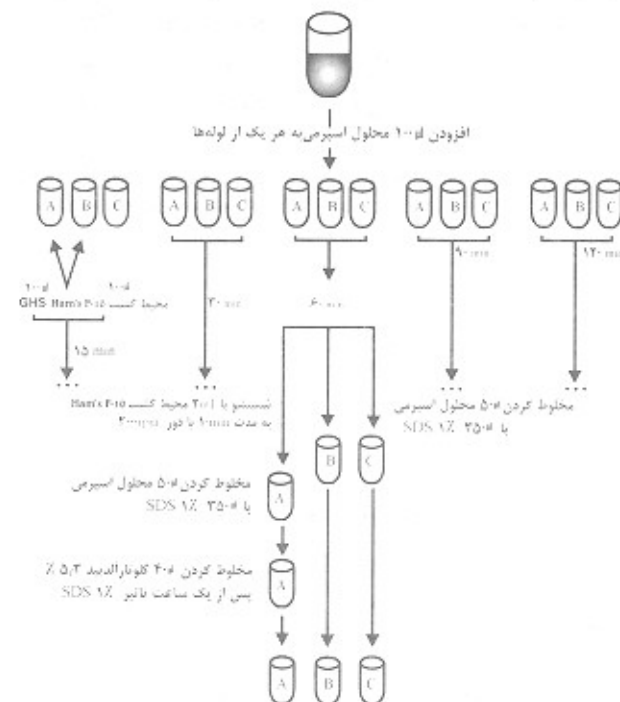


شکل ۲: فتومیکروگراف از اسیرمی که بر آن SDS یک درصد تاثیر داده شده است
(فاز کنترل، رنگ آمیزی: پاپانیکولا، بزرگمایی: $\times 400$)



شکل ۳: فتومیکروگراف از اسیرمی که بر آن گلو تائون تاثیر داده شده است
(فاز کنترل، رنگ آمیزی: پاپانیکولا، بزرگمایی: $\times 400$)

قبل از افزودن SDS یک درصد محلول اسیرم حاوی گلو تائون توسط محیط کشت Ham's F-10 به مدت ۱۰ دقیقه شستو شد و بعد از شستو به ۱ درصد اضافه شد این گروه به عنوان شستو در نظر گرفته شد. در گروه کنترل نیز به ۵۰ میکرو لیتر از محلول اسیرمی، ۳۵۰ میکرو لیتر SDS یک درصد اضافه شد (دیاگرام ۲).



دیاگرام ۲: نحوه تاثیر غلظت ثابتی از گلو تائون بر طی زمانهای مختلف

A = گروه شستو (W)، B = گروه غیر شستو (NW) و C = گروه کنترل. برای سهولت فقط یک گروه سه تایی از اولتهای A، B و C نشان داده شده اند که به آنها SDS یک درصد و گلو تائون ۲/۵ درصد اضافه شده است. W = Wash, NW = Non Wash, C = Control

پس از افزودن SDS یک درصد به هر سه گروه فوق (کنترل، شستو و غیر شستو) پس از یک ساعت به همه آنها ۴۰۰ میکرو لیتر گلو تائون ۲/۵ درصد حل شده در بورات بافر ۰/۰۵ مولار (pH=۹) اضافه شد. سپس یک قطره از محلول اسیرمی هر یک از گروههای فوق روی لام قرار گرفته و پس از رنگ آمیزی پاپانیکولا روی آن با لامل پوشانده شد.

در این رنگ آمیزی، گسترشهای تهیه شده پس از تثبیت در محلولی با حجمهای مساوی اتانول ۹۵ درصد و اثر به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه با درجات نزولی الکل آبدهی شده و پس از رنگ آمیزی با همتوکسیلین به کمک درجات صعودی الکل آبگیری به عمل آمد. پس از آن گسترشها با محلول اورنج G و سپس محلول EA-50 رنگ آمیزی شدند (۱۴). پس از رنگ آمیزی ۱۰۰ اسیرم از هر قطره با بزرگمایی $\times 400$ میکروسکوپ نوری مطابق روش زیر درجه بندی شدند:

درجه ۱: اسیرم با سر کاملاً طبیعی، درجه ۱: اسیرم با سر نسبتاً متورم، درجه ۲: اسیرم با سر کاملاً متورم،

در غلظت ۱۰ میلی مولار گلوکاتایون، بین گروههای غیرشستشو و کنترل تفاوت معنی داری مشاهده شد ولی بین این غلظت و غلظتهای ۱ و ۵ میلی مولار تفاوت معنی داری وجود نداشت. غلظتهای ۱۵ و ۲۰ میلی مولار گلوکاتایون تأثیر بهتری بر کروماتین اسپرم داشته و اختلاف معنی داری را نسبت به غلظتهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار نشان دادند ($P < 0.05$) (جدول ۲). همچنین در غلظتهای ۱۵ و ۲۰ میلی مولار بین گروههای غیر شستشو و کنترل اختلاف معنی دار بود. در گروه غیر شستشو بین این دو غلظت تفاوت معنی داری نبودند (جدول ۱ و ۲).

جدول ۲: مقایسه بین میانگین و انحراف معیار Score غلظتهای مختلف گلوکاتایون بر طی زمانهای مختلف در گروه غیرشستشو (NW)

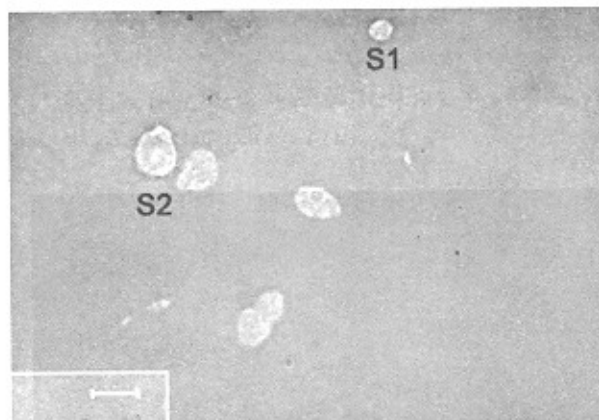
غلظت mM	۱۵	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰
۱	۱۶/۲±	۱۱±	۹/۶±	۱۲/۶±	۱۲/۶±
	۸/۵	۵/۸	۶/۸	۸/۳	۷/۶
۵	۱۷/۴±	۲۲/۱±	۲۱/۷±	۲۷/۹±	۲۵±
	۱۳/۶	۱۶/۷	۱۲/۶	۱۲/۸	۱۱/۵
۱۰	۲۲/۵±	۲۲/۲±	۲۹/۲±	۳۰/۸±	۳۲/۸±
	۲۱/۸	۲۳/۹	۲۹/۷	۲۱/۵	۱۷/۱
۱۵	۶۸±	۶۵±	۸۱/۴±	۷۹/۶±	۶۸/۳±
	۳۷/۶	۴۲/۴	۵۱/۹	۴۰/۳	۴۱/۹
۲۰	۶۹/۴±	۶۶/۱±	۸۳/۲±	۸۲/۱±	۷۶/۵±
	۳۵/۴	۲۲/۸	۲۸/۶	۲۸/۷	۲۳/۹
۳۰	۱۳۰/۳±	۱۳۷/۶±	۱۴۳/۲±	۱۴۴/۱±	۱۳۹/۱±
	۱۹	۱۹/۸	۱۰	۱۰/۴	۲۱/۶
۸۰	۱۸۰/۲±	۱۸۶±	۱۸۵/۳±	۱۸۵/۷±	۱۸۶/۲±
	۱۶/۷	۶/۷	۱۰/۴	۶/۸	۷

* اختلاف معنی دار با غلظتهای ۱ و ۵ mM ($P < 0.05$). □ اختلاف معنی دار با غلظت ۱۰ mM ($P < 0.05$). ■ اختلاف معنی دار با غلظت ۱۵ mM ($P < 0.05$). □ اختلاف معنی دار با غلظت ۲۰ mM ($P < 0.05$). ○ اختلاف معنی دار با غلظت ۳۰ و ۸۰ mM ($P < 0.05$).

گلوکاتایون بهترین تأثیرش را در گروه غیرشستشو در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار بر اسپرم گذاشته و در این غلظتها میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرم (NCD) نسبت به سایر غلظتهای گلوکاتایون تفاوت چشمگیری را نشان داده است که از نظر آماری این تفاوتها معنی دار بود ($P < 0.05$). حتی بین این دو غلظت نیز اختلاف معنی داری وجود داشت (جدول ۲). در این بررسی مشخص شد که در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار بین گروه غیرشستشو و کنترل اختلاف فراوانی وجود داشت که از نظر آماری معنی دار بودند ($P < 0.05$) (جدول ۱).

* تأثیر غلظتهای مختلف گلوکاتایون بر اسپرم در گروه شستشو

در گروه شستشو غلظتهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار گلوکاتایون نتوانستند تأثیر چندانی بر میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرم (NCD) بگذارند (جدول ۱ و ۳). در غلظتهای ۱ و ۵ میلی مولار بین گروههای



شکل ۴: فتومیکروگراف از اسپرمی که بر آن گلوکاتایون با غلظت ۸۰ mM و SDS یک درصد تأثیر داده شده است. اسپرمها با درجات یک (S1) و دو (S2) دیده میشوند. (باز کنتراست، رنگآمیزی پاپانیکولا، بزرگنمایی: ۴۰۰x)

یافته‌ها

* تأثیر غلظتهای مختلف گلوکاتایون بر اسپرم در گروه غیر شستشو

غلظتهای مختلف ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی مولار بر اسپرم تأثیر داشته و نتایج حاصل از این تحقیق در گروه غیرشستشو نشان داد که گلوکاتایون در غلظتهای ۱ و ۵ میلی مولار بر نامتراکم شدن کروماتین هسته اسپرم (NCD) نسبت به گروه کنترل تأثیر چندانی نداشت. همچنین بین این دو غلظت نیز تفاوت معنی داری وجود نداشت ($P > 0.05$) (جدول ۱ و ۲).

۸۰

جدول ۱: مقایسه بین میانگین و انحراف معیار score غلظتهای مختلف گلوکاتایون در طی زمانهای مختلف در سه گروه غیرشستشو (NW)، شستشو (W) و کنترل (C).

غلظت Min	۱۵	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰
۱	NW ۱۶/۲± W ۱۶/۲± C ۱۱/۵±	۱۱± ۱۱/۳± ۵/۸±	۹/۶± ۱۱/۹± ۶/۸±	۱۲/۶± ۱۲/۶± ۸/۳±	۱۲/۶± ۱۰/۶± ۷/۶±
۵	NW ۱۷/۴± W ۲۲/۱± C ۲۱/۷±	۲۲/۱± ۲۱/۷± ۱۲/۶±	۲۷/۹± ۲۷/۹± ۱۲/۶±	۲۵± ۲۵± ۱۱/۵±	۲۵± ۲۵± ۱۱/۵±
۱۰	NW ۲۲/۵± W ۲۲/۲± C ۲۹/۲±	۲۲/۲± ۲۲/۲± ۲۹/۲±	۳۰/۸± ۳۰/۸± ۲۱/۵±	۳۲/۸± ۳۲/۸± ۱۷/۱±	۳۲/۸± ۳۲/۸± ۱۷/۱±
۱۵	NW ۶۸± W ۶۵± C ۸۱/۴±	۶۵± ۶۵± ۸۱/۴±	۷۹/۶± ۷۹/۶± ۴۰/۳±	۶۸/۳± ۶۸/۳± ۴۱/۹±	۶۸/۳± ۶۸/۳± ۴۱/۹±
۲۰	NW ۶۹/۴± W ۶۶/۱± C ۸۳/۲±	۶۶/۱± ۶۶/۱± ۸۳/۲±	۸۲/۱± ۸۲/۱± ۷۶/۵±	۷۶/۵± ۷۶/۵± ۲۳/۹±	۷۶/۵± ۷۶/۵± ۲۳/۹±
۳۰	NW ۱۳۰/۳± W ۱۳۷/۶± C ۱۴۳/۲±	۱۳۷/۶± ۱۳۷/۶± ۱۴۳/۲±	۱۴۴/۱± ۱۴۴/۱± ۱۳۹/۱±	۱۴۴/۱± ۱۴۴/۱± ۱۳۹/۱±	۱۳۹/۱± ۱۳۹/۱± ۱۳۹/۱±
۴۰	NW ۱۸۰/۲± W ۱۸۶± C ۱۸۵/۳±	۱۸۶± ۱۸۶± ۱۸۵/۳±	۱۸۵/۳± ۱۸۵/۳± ۱۸۵/۷±	۱۸۵/۷± ۱۸۵/۷± ۱۸۶/۲±	۱۸۶/۲± ۱۸۶/۲± ۱۸۶/۲±
۸۰	NW ۱۸۰/۲± W ۱۸۶± C ۱۸۵/۳±	۱۸۶± ۱۸۶± ۱۸۵/۳±	۱۸۵/۳± ۱۸۵/۳± ۱۸۵/۷±	۱۸۵/۷± ۱۸۵/۷± ۱۸۶/۲±	۱۸۶/۲± ۱۸۶/۲± ۱۸۶/۲±

* اختلاف معنی دار با گروه کنترل (C) ($P < 0.05$)

** اختلاف معنی دار با گروه غیرشستشو (NW) ($P < 0.05$)

نظر آماری معنی دار نبودند ($P > 0.05$) (جدول ۱). فقط در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی مولار گلو تاتیون اختلاف معنی داری وجود داشت که این اختلاف در همه زمانهای تأثیر گلو تاتیون (۱۵ تا ۲۰ دقیقه) در این غلظتها مشاهده شد ($P < 0.05$) (جدول ۱).

د) تأثیر عامل زمان در غلظتهای مختلف گلو تاتیون

در هر دو گروه شستشو و غیر شستشو عامل زمان تأثیر چندانی بر میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرمها نداشته است و در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار گلو تاتیون حتی پس از گذشت ۱۵ دقیقه اسپرمها درجه بالایی از نامتراکم شدن را نشان دادند (جدول ۱، ۲ و ۳).

بحث

یکی از مهمترین عواملی که بر قدرت باروری اسپرم تأثیر می‌گذارد وضعیت تراکم و پایداری کروماتین^۱ آن است و همان طوری که در مقدمه این مقاله ذکر شد کروماتین اسپرم پس از نفوذ به درون اوپلاسم نامتراکم شده که این امر سبب تشکیل پیش هسته نر می‌شود (۷، ۱۰). امروزه روشهای مختلفی برای ارزیابی وضعیت تراکم اسپرمها وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش رنگ آمیزی آنیلین بلو و آکریدین اورنج (AO)^۲ (۱۷، ۱۸، ۱۹)، کرومومایسین A₃ (CMA₃)^۳ (۲۰)، روش فلوئیدومتري^۴ و سدیم دودسبیل سولفات (۲۱، ۲۲) اشاره نمود.

مطالعات Bianchi و Sakkas در سال ۱۹۹۶ نشان می‌دهد که فرآیند لقاح و NCD پس از لقاح وابسته به وجود پایداری مطلوب کروماتین است و پایداری بیش از حد کروماتین اسپرم که در اثر تشکیل بیش از حد پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامینی متصل به DNA اسپرم به وجود می‌آید یا عدم پایداری کروماتین می‌تواند در فرآیند لقاح و NCD اسپرم مؤثر باشد (۱۳، ۲۰). در طی تزریق اسپرم به درون اووسیت (ICSI) به دلیل انتقال اسپرم با غشای پلاسمایی شانس دسترسی فاکتورهای القا کننده NCD (اعم از آنزیمی یا شیمیایی در درون اوپلاسم) به کروماتین اسپرم کاهش می‌یابد. لذا در صورتی که فرآیند NCD را قبل از ICSI در اسپرم القا نماییم ممکن است درصد لقاح افزایش یابد.

Calvin و Bedford در سال ۱۹۷۱ برای القا NCD در اسپرمهای برخی از پستانداران نظیر موش، هامستر و گاو از SDS و دی‌تیوتریتول (DTT) به عنوان احیا کننده پلهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامینی استفاده کردند (۲۴). پس از آن، Gopalkrishnan، Bjorndahl، Kvist و EDTA (به عنوان کیلات کننده Zn متصل به گروههای تیولی (-SH) پروتامین) سبب القای NCD اسپرم انسان شدند (۲۲، ۲۳، ۲۵).

در این تحقیق، ما نیز از SDS که روش شناخته شده‌ای برای القای

شستشو و کنترل هیچ گونه اختلاف معنی داری دیده نشد ولی این اختلاف در غلظت ۱۰ میلی مولار پس از گذشت ۶۰ دقیقه معنی دار بود (جدول ۱). در گروه شستشو بین این سه غلظت تفاوت معنی داری در سطح $P > 0.05$ دیده نشد. در غلظت ۱۵ میلی مولار گلو تاتیون، تفاوت معنی داری بین گروههای شستشو و کنترل دیده نشد در حالی که در غلظت ۲۰ میلی مولار پس از گذشت ۳۰ دقیقه این اختلاف معنی دار بود (جدول ۱). بین این غلظتها (۱۵ و ۲۰ میلی مولار) نیز تفاوت معنی دار در گروه شستشو مشاهده نشد ($P > 0.05$) (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین و انحراف معیار Score غلظتهای مختلف گلو تاتیون طی زمانهای مختلف در گروه شستشو (W)

غلظت mM زمان min	۱۵	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰
۱	۱۶/۲± ۸/۸	۱۲/۳± ۷/۱	۱۱/۹± ۹/۳	۱۲/۷± ۹/۹	۱۰/۶± ۶/۵
۵	۲۳± ۱۱/۲	۱۸/۷± ۱۲/۸	۱۹± ۱۱/۶	۲۴± ۱۱/۷	۲۲/۸± ۲۱/۷
۱۰	۲۴/۳± ۱۲/۹	۲۶/۱± ۱۸/۷	۳۴/۸± ۲۲	۳۹/۱± ۱۷/۳	۲۸/۶± ۱۶/۳
۱۵	۴۳± ۲۰/۶	۳۷/۱± ۳۵/۲	۶۹/۳± ۴۸/۸	۵۷/۲± ۳۶/۸	۵۲/۳± ۳۹/۵
۲۰	۴۳/۷± ۱۵/۷	۴۸/۷± ۲۴	۵۶/۷± ۲۹/۲	۵۵/۷± ۱۹	۶۰/۸± ۳۴/۶
۳۰	۹۲/۵± ۴۱/۷±	۹۷/۳± ۲۳/۳±	۱۱۲/۳± ۲۵/۷±	۱۰۱/۱± ۲۱/۸±	۱۰۸/۲± ۲۶/۵±
۸۰	۱۱۲/۵± ۲۲/۱	۱۱۲/۷± ۲۵/۶	۱۲۱/۲± ۲۲/۵	۱۰۷/۹± ۱۴/۸	۱۱۵/۲± ۲۵/۶

* اختلاف معنی دار با غلظت ۱۰ mM ($P < 0.05$) □ اختلاف معنی دار با غلظت ۵ mM
○ اختلاف معنی دار با غلظتهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ mM ($P < 0.05$)

گلو تاتیون در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار تفاوتی زیادی را نسبت به سایر غلظتهایش نشان داد که از نظر آماری معنی دار بود. همچنین در این غلظتها بین گروههای شستشو و کنترل تفاوتی معنی داری در سطح $P < 0.05$ مشاهده نشد (جدول ۱). در گروه شستشو بر خلاف گروه غیر شستشو بین غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار تفاوت معنی دار وجود نداشت و هر دو غلظت گلو تاتیون به یک اندازه سبب القای NCD شدند (جدول ۳).

* مقایسه گروههای شستشو و غیر شستشو در غلظتهای مختلف گلو تاتیون

در غلظتهای ۱ تا ۲۰ میلی مولار گلو تاتیون در طی زمانهای مختلف تأثیر گلو تاتیون (۱۵ تا ۲۰ دقیقه)، اگر چه با افزایش غلظت بر میزان تفاوت بین گروههای شستشو و غیر شستشو افزوده شد ولی این تفاوتها از

1. Chromatin Stability
2. Acridine Orange
3. Chromomycin A₃
4. Flowcytometry

هسته اسپرم می‌شود و آنرا نامتراکم می‌کند، به عبارت دیگر GSH بدون شکسته شدن غشای پلاسمایی اسپرم توسط SDS قادر به نفوذ به داخل آن و القای NCD نیست و چنانچه قبل از اسپرمها را در معرض GSH دهم به دلیل وجود اسپرمولما در اسپرم سالم و عدم نفوذ GSH به درون اسپرم پس از ICSI ممکن است هسته اسپرم متورم نشده و همچنان متراکم باقی بماند، این پرمشی است که تاکنون هیچ منبعی به آن اشاره نکرده است.

برای پاسخ به چنین پرسشی ما در گروه شستشو پس از تأثیر GSH بر اسپرم نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با محیط کشت Ham's F-10 شستشو دادیم و بعد SDS به آنها افزودیم. این شستشو سبب پاک شدن محیط اطراف اسپرمها از GSH شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در گروه شستشو با پاک شدن GSH از محیط اطراف اسپرم باز هم سر اسپرمها متورم شده و اختلاف آن با گروههای کنترل و غیرشستشو در غلظتهای بالای GSH در سطح $P > 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۱). معنی‌دار بودن این اختلاف به این مفهوم است که در گروه شستشو گلوکوتائون پس از افزوده شدن به اسپرمها، توانسته است که از غشای پلاسمایی اسپرمها عبور کرده و وارد هسته شود و پیوندهای دی‌سولفیدی را احیا کند و SDS با از بین بردن غشای پلاسمایی اسپرم فقط تورم سر اسپرم را به ما نشان می‌دهد، نه اینکه ابتدا SDS غشای پلاسمایی اسپرمها را از بین برده و بعد GSH به درون آن نفوذ کرده باشد. همچنین اگر چه پیوندهای دی‌سولفیدی بین پروتئینها در حضور GSH شکسته شدند ولی به علت وجود غشای پلاسمایی اسپرم فضای کافی برای باز شدن کروماتین اسپرمها در محیط *in vitro* وجود ندارد که این فضا با تأثیر SDS بر غشای پلاسمایی اسپرمها به دست می‌آید. از طرف دیگر از مقایسه بین گروههای شستشو و غیر شستشو می‌توان چنین نتیجه گرفت که وجود GSH در محیط اطراف اسپرمها تأثیر مضاعفی بر القای NCD اسپرمها می‌گذارد و این نشان می‌دهد که احتمالاً با برداشته شدن GSH از محیط اطراف اسپرمها، برخی از پیوندهای دی‌سولفیدی بین گروههای تیولی آزاد مجدداً ایجاد می‌شوند.

بر اساس مطالعات فوق می‌توان نتیجه گرفت که GSH قادر است در محیط *in vitro* سبب القای NCD در اسپرمها شود که این اثر GSH وابسته به غلظت بوده و در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار، میزان NCD اسپرمها بیشتر است. همچنین GSH قادر است که از غشای پلاسمایی اسپرمها گذشته و سبب القای NCD شود و چنانچه قبل از ICSI، GSH بر اسپرمهایی که از کروماتین بسیار پایداری برخوردار هستند تأثیر داده شود، ممکن است درصد لقاح افزایش یابد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران که کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این طرح را بر مبنای قرارداد شماره ۱۹۷۶/۱۷/۲۰ پ/مورخ ۷۵/۱۲/۴ تأمین نمودند، ابراز می‌دارند.

NCD اسپرمها در محیط *in vitro* است و گلوکوتائون (GSH) به عنوان احیا کننده پلهای دی‌سولفیدی که به صورت یک بیوفاکتور طبیعی در اووپلاسم به منظور القای NCD اسپرم مصرف می‌شود استفاده کردیم. در این بررسی نمونه‌ها در سه گروه شستشو، غیر شستشو و کنترل دسته‌بندی شدند و در گروههای اول و دوم (غیر شستشو و شستشو) گلوکوتائون با غلظتهای ۱ تا ۸۰ میلی‌مولار افزوده شد و سپس طی زمانهای ۱۵ تا ۱۲۰ دقیقه برای هر غلظت به آنها SDS اضافه شد. در گروه کنترل به جای GSH از محیط کشت Ham's F-10 استفاده شد. بعد از طی زمانهای فوق به نمونه‌های این گروه SDS افزوده شد (دیاگرام ۲).

Reyes و همکارانش در سال ۱۹۹۶ با بررسی که روی کروماتین اسپرم هاستر انجام دادند به این نتیجه رسیدند که GSH و هیپازین (پلی‌آنیونی که بر سر اتصال با پروتئین به رقابت با DNA بر می‌خیزد) به تنهایی قادر به القای NCD در اسپرم هاستر نیستند ولی مخلوط این دو می‌تواند بر اسپرم این جانور تأثیر بگذارد که این تأثیر وابسته به زمان و حرارت است (۲۶). بررسیهای ما نیز که بر روی اسپرم انسان صورت گرفت مشخص کرد که GSH در محیط *in vitro* می‌تواند سبب القای NCD و تورم سر اسپرم شود که این تورم با تأثیر SDS یک درصد بر اسپرم قابل مشاهده بود. تأثیر GSH بر اسپرم به این صورت است که GSH در گروه غیر شستشو در غلظتهای ۱ تا ۱۰ میلی‌مولار GSH، بر کروماتین اسپرم حتی پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه تأثیر ناچیزی داشته است ($Scoro < 50$) و در غلظتهای ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار تأثیر GSH بر کروماتین اسپرم نسبتاً خوب بود ($Scoro > 50$ و $Scoro > 80$). در حالی که غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار GSH توانسته است میزان NCD بالایی را در اسپرمها القا نماید ($Scoro > 135$) (جدول ۱ و ۲). در گروه شستشو نیز با افزایش غلظت GSH درصد بیشتری از اسپرمها نامتراکم شدند. (جدول ۱ و ۳). از طرف دیگر در تحقیقات ما مشخص شد که تأثیر GSH بر اسپرم انسان طی زمانهای ۱۵ تا ۱۲۰ دقیقه تغییر محوسی در میزان NCD اسپرمها ایجاد نکرد (جدول ۱). بنابراین شاید بتوان گفت که تأثیر GSH بر کروماتین اسپرم وابسته به غلظت بوده ولی وابسته به زمان نیست. گرچه طبق بررسیهای Reyes و Sanchez هپازین و GSH به تنهایی و مستقل از هم قادر به القای NCD در کروماتین اسپرمهای هاستر، موش و موش صحرایی نبودند ولی طبق بررسیهای Reyes و همکارانش مشخص شد که هپازین با غلظت ۱۵۳/۸ میلی‌مولار به تنهایی و مستقل از تیولها قادر به القای NCD انسان پس از ۶ ساعت انکوباسیون است (۲۶، ۲۷). از طرف دیگر، نتایج حاصل از تحقیقات ما نیز نشان داد که GSH نیز به تنهایی و مستقل از هپازین می‌تواند سبب القای NCD در اسپرم انسان شود و این عمل را در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار به خوبی نشان داد. بنابراین شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که در اسپرم انسان برخلاف اسپرم سایر پستانداران جوته GSH و هپازین به تنهایی و مستقل از یکدیگر قادر به القای NCD هستند. ممکن است این نکته مطرح شود که ابتدا SDS غشای پلاسمایی اسپرم را برداشته و بعد GSH وارد

References

- De Yi Liu, HWG Baker: Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fert Steril* 1992; 58(3): 465-483
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW: Sequence- specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987; 236: 962-964
- Seligman J, Kosower NS, Weissenberg R, Shalgi R: Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J Reprod Fert* 1994; 101: 435-443
- Marushige Y, Marushige K: Transformation of sperm histon during formation and maturation of rat spermatozoa. *J Biol Chem* 1975; 250(1): 39-45
- Kvist U: Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta Physiol Scand* 1980; 109: 79-84
- Kvist U, Bjorndahl L: Zinc preserves an inherent capacity for human sperm chromatin decondensation. *Acta Physiol Scand* 1985; 124: 195-200
- Perreault SD, Wolf RA, Zirkin BR: The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol* 1984; 101: 160-167
- Gonzales Esterilla JA, Coney P, Ostash K, Karabirus D: Dithiothreitol effects on the viscosity and quality of human semen. *Fert Ster*, 1994; 62(6): 1238-1243
- Japer S, Wichman J, Kremer J: Studies on the decondensation of human mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions *J Exp Zool*, 1990; 256: 315-322
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VL: Importance of glutathione in acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125: 181-186
- Meister A, Anderson ME: Glutathione, *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 711-760
- Palermo GD, Cohen J, Rosenwaks Z: Intracytoplasmic sperm injection: A powerful tool to overcome fertilization failure *Fert Steril* 1996; 65(5): 899-908
- Sakkas D, Urner F, Bianchi PG: Chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11(4): 837-843
- Drury RAB, Wallington D, Carleton S: Histological technique, 5ed. Oxford university press, 1980
- Kjellberg S, Bjorndahl L, Kvist U: Sperm chromatin stability and zinc binding properties in semen from men in barren unions. *Int J Androl* 1992; 15: 103-113
- Rosenberg L, Rao KM, Bjorndahl L: Changes in human sperm chromatin stability during preparation for in vitro fertilization. *Int J Androl* 1990; 13: 287-296
- Foresta C, Zorzi M, Rossato M: Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992; 15: 330-337
- Hingst O, Blotner S, Franz C: Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia* 1995; 27: 275-279
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H: The Acridine orange test: A clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Hum Reprod* 1996; 11: 784-789
- Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F: Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: Evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(3): 139-144
- Engh E, Clausen OPF, Scholberg A: Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry. *Int J Androl* 1992; 15:407-415
- Kvist U: Sperm nuclear chromatin decondensation ability. An in vitro study on ejaculated human spermatozoa. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980; 486:1-24
- Gopalkrishnan K, Hinduga IN, Anand Kumar TC: In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: assessing fertilizing potential *Arch. Androl* 1991; 27: 43-50
- Calvin HL, Bedford JM: Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fert Suppl* 1971; 13: 65-75
- Bjorndahl L, Kjellberg S and Kvist U: Ejaculatory sequence in men with low sperm chromatin-zinc. *Int J Androl* 1991; 14: 174-178
- Reyes R, Sanchez-Vazquez ML, Merchant-Larios H, Rosado A, Delgado NM: Effect of heparin-reduced glutathione on hamster sperm DNA unpacking and nuclear swelling. *Arch Androl* 1996; 37: 33-45
- Reyes R, Rosado A, Hernandez O, Delgado NM: Heparin and glutathione: Physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Res* 1996; 23: 39-47

